

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-238686

(43)公開日 平成9年(1997)9月16日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 48/00	A E D		A 6 1 K 48/00	A E D
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 1/21			C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02			C 1 2 P 21/02	C

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 31 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-50678

(22)出願日 平成8年(1996)3月7日

(71)出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72)発明者 日沼 州司

茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田

春日ハイツ1402号

(72)発明者 藤井 亮

茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田

春日ハイツ303号

(74)代理人 弁理士 朝日奈 忠夫 (外1名)

(54)【発明の名称】 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その製造法および用途

(57)【要約】

【課題】レセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング等における試薬として用いることができる新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その製造法および用途の提供。

【解決手段】本発明のヒト胃、小脳由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩およびそれをコードするDNAは、レセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成等における試薬として用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩。

【請求項2】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩。

【請求項3】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または請求項2記載の部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

【請求項4】配列番号：2で表される塩基配列を有する請求項3記載のDNA。

【請求項5】請求項3記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項6】請求項3記載のDNAまたは請求項5記載の組換えベクターを保持する形質転換体。

【請求項7】請求項6記載の形質転換体を培養することを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩の製造方法。

【請求項8】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩に対するリガンドの決定方法。

【請求項9】(i)請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩、およびリガンドを接触させた場合と(ii)請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩との結合性を変化させる化合物もしくはその塩のスクリーニング方法。

【請求項10】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩を含有してなる、リガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩との結合性を変化させる化合物もしくはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項11】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト胃またはヒト小脳由来の新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質、該蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法、該蛋白質及びDNAの用途に関する。

【0002】

【従来の技術】多くのホルモンや神経伝達物質は細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質の多くは共役している guanine nucleotide-binding protein

(以下、G蛋白質と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質と総称される。G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として非常に重要な役割を担っている。

【0003】胃や小腸などの消化器官では、多くのホルモン・ホルモン様物質・神経伝達物質あるいは生理活性物質などによる調節のもとで、種々の消化液が分泌され、食物の消化・吸収が行われている。これらの物質は、胃や小腸などに存在する、それぞれに対応するレセプターによってその分泌が制御されていると考えられている。特に、消化管ホルモンと呼ばれるセクレチン、ガストリン、コレシストキニン、パソアクティブ・インテスティナル・ポリペプチド、モチリン、サフスタンスP、ソマトスタチン、ニューロテンシンなどは、消化管内腔からの物理的・化学的刺激あるいは神経性の刺激に反応して分泌されるが、その真の生理作用は不明な点も多い。また、モチリンはレセプター蛋白質cDNAの構造に関する知見は、これまでに報告されていない。さらに、未知のレセプター蛋白質やレセプター蛋白質サブタイプが存在するかどうかについても分かっていなかった。

【0004】胃や小腸の複雑な機能を調節する物質とその特異的レセプターとの関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。そして胃や小腸の機能を調節するためのレセプター蛋白質に対するアゴニスト/アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、レセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。近年、G蛋白質共役型レセプター蛋白質がその構造の一部にアミノ酸配列の類似性を示すことを利用して、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (Polymerase Chain Reaction: 以下、PCRと略称する) 法によって新規レセプター蛋白質をコードするDNAを探索する方法が行われるようになった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ヒト胃またはヒト小脳由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、該蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法、および該蛋白質ならびにDNAの用途を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために、鋭意研究を重ねた結果、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをより効率的に単離するための合成DNAプライマーを用いてヒト胃またはヒト小脳由来のcDNAをPCR法により増幅することに成功し、その解析を進めた。その結果、本発明者らは、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするヒト由来のcDNAを単離し、その構造を決定することに成功した。そして、このcDNAは、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とDNAおよびアミノ酸配列の部分的な相同性が認められたことから、ヒトの細胞で発現機能している新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードしているDNAであることを見いだした。本発明者らは、これらの知見から、これらのDNAを用いれば、該レセプター蛋白質を製造することもできることを見いだした。さらに、本発明者らは、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを適当な手段で発現させた該レセプター蛋白質を用いれば、レセプター結合実験または細胞内セカンドメッセンジャーの測定等を指標に、生体内あるいは天然・非天然の化合物から該レセプター蛋白質に対するリガンドをスクリーニングすることができ、さらには、リガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害するあるいは促進させる化合物のスクリーニングを行なうこともできることを見いだした。

【0007】これらの知見を基に、本発明者らはさらに鋭意研究した結果、本発明を完成した。本発明は、

- (1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、
- (2) 上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩、
- (3) 上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または上記(2)項記載の部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、
- (4) 配列番号：2で表される塩基配列を有する上記(3)項記載のDNA、
- (5) 上記(3)項記載のDNAを含有する組換えベクター、
- (6) 上記(3)項記載のDNAまたは上記(5)項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、
- (7) 上記(6)項記載の形質転換体を培養することを特徴とする上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、
- (8) 上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩に対するリガンドの決定方法、

(9) (i) 上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩、およびリガンドを接触させた場合と(ii) 上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩との結合性を变化させる化合物もしくはその塩のスクリーニング方法、

10

(10) 上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩を含有してなる、リガンドと上記

(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩との結合性を变化させる化合物もしくはその塩のスクリーニング用キット、および

(11) 上記(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体である。

20

【0008】より具体的には、

(12) 蛋白質が、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1個または2個以上のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1個または2個以上のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、また配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1個または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、

30

(13) 標識したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物もしくはその塩のスクリーニング方法、

40

(14) 標識したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物もしくはその塩のスクリー

50

ーニング方法、

(15) 標識したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第

(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物もしくはその塩のスクリーニング方法、

【0009】(16) 第(6)項記載の形質転換体の培養によって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に標識したリガンドを接触させた場合と、第(6)項記載の形質転換体の培養によって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に標識したリガンドおよび試験化合物を接触させた場合における、標識したリガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(17) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物を接触させた場合と、活性化する化合物および試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害するあるいは促進させる化合物もしくはその塩のスクリーニング方法、

(18) 第(6)項記載の形質転換体の培養によって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物を接触させた場合と、第

(6)項記載の形質転換体の培養によって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物および試験化合物を接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物もしくはその塩のスクリーニング方法、

【0010】(19) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする第(10)項記載のスクリーニング用キット、

(20) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とす

る第(10)項記載のスクリーニング用キット、および(21) 第(10)項、第(19)項または第(20)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる化合物もしくはその塩を提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、温血動物(例えば、トリ、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル、ヒトなど)のあらゆる組織(例えば、胃、下垂体、脾臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など)または細胞などに由来するG蛋白質共役型レセプター蛋白質であつて、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものであれば何なるものであつてもよい。すなわち、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質などの他に、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と約85~99.9%の相同性、より好ましくは約90~99.9%の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが挙げられる。実質的に同質の活性としては、例えばリガンド結合活性、シグナル情報伝達などが挙げられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強弱、レセプター蛋白質の分子量などの量的要素は異なつていてもよい。

【0012】より具体的には、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質が挙げられる。また、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列中の1個または2個以上(好ましくは、2個以上20個以下、より好ましくは2個以上10個以下)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列に1個または2個以上(好ましくは、2個以上20個以下、より好ましくは2個以上10個以下)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列中の1個または2個以上(好ましくは、2個以上20個以下、より好ましくは2個以上10個以下)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども挙げられる。さらに、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質には、N末端のMetが保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₆アシル基など)で保護されているもの、G1uのN端側が生体内で切断され、該G1uがピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₆アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれ

る。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0013】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩は、温血動物の組織または細胞から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位などが挙げられる。具体的には、例えば第一膜貫通領域よりN末端側の部分や、第七膜貫通領域よりC末端側の部分あるいはこれらを除く第一から第七膜貫通領域までの部分などが用いられる。また、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。さらに具体的には、N末端から1個～4個のアミノ酸、C末端から1個～33個のアミノ酸や、疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部を含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

【0014】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0015】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の～に記載された方法が挙げられる。

M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験。丸善(株) (1975年)

矢島治明 および柳原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

10 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のタンパク質を精製単離することができる。上記方法で得られる蛋白質が遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0016】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、本発明の配列番号：1のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ヒトゲノムDNA、ヒトゲノムDNAライブラリー、ヒト組織・細胞由来のcDNA、ヒト組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってよい。また、組織・細胞よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する。）によって増幅することもできる。より具体的には、配列番号：1のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

【0017】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAをヒトG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別する。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning 2nd (ed. ; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。クローニングされたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコー

ドするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

【0018】G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

【0019】形質転換する際の宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHIプロモーターなどが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどがそれぞれ利用できる。なお、発現にエンハンサーの利用も効果的である。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリフォスファターゼ・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイテイングファクターα・シグナル配列、インペルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。

【0020】宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌、バチルス属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)]などが用いられる。バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) M1114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)]などが用いられる。

【0021】酵母としては、たとえばサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12などが用いられる。昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる[前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。動物細胞としては、たとえばサル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (dhfr CHO細胞), マウスL細胞, マウスミエローマ細胞, ヒトFL細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なわれる。バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なわれる。酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)に記載の方法に従って行なわれる。昆虫細胞を形質転換するには、たとえばバイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なわれる。動物細胞を形質転換するには、たとえばウイルス学 (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。このようにして、G蛋白質共役型レセプター蛋白質

をコードするDNAを含有する発現バクターで形質転換された形質転換体を得られる。

【0022】宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5〜8が好ましい。

【0023】エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15〜43℃で約3〜24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30〜40℃で約6〜24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら, 「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)」や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら, 「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)」〕が挙げられる。培地のpHは約5〜8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃〜35℃で約24〜72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0024】宿主が昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2〜6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3〜5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たと

ば約5〜20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], D MEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)]などが用いられる。pHは約6〜8であるのが好ましい。培養は通常約30℃〜40℃で約15〜60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0025】より具体的には、後述の実施例6で得られる本発明のヒト型G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するプラスミドhBL5を、E. coli JM109に導入して形質転換体E. coli JM109/p hBL5を得る。得られたE. coli JM109/p hBL5をLB培地〔トリプトン 1%, イーストエキストラクト 0.5%, NaCl 0.5%〕にアンピシリン 50 μg/mlを添加した培地に懸濁し、37℃で10〜20時間培養することにより、ヒト型G蛋白質共役型レセプター蛋白質を産生させる。

【0026】上記培養物からG蛋白質共役型レセプター蛋白質を分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりG蛋白質共役型レセプター蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトンX-100 (登録商標。以下、TMと省略することがある。)などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にG蛋白質共役型レセプター蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液に含まれるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気

泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0027】かくして得られるG蛋白質共役型レセプター蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するG蛋白質共役型レセプター蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。かくして生成するG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性は標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0028】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAおよびG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、抗体および抗血清の入手、組換え型レセプター蛋白質の発現系の構築、同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成等における試薬として用いることができ、また、遺伝子治療等の薬物として用いることができる。特に、本発明の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、部分ペプチド、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAおよび抗体の用途について、以下により具体的に説明する。

【0029】(1) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドを探索しまたは決定するための試薬として有用である。すなわち、本発明は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。試験化合物として

は、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP（バソアクティブ・インテスチナル・アンδρο・リレイトド・ペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニン・ジーン・リレイトド・ペプチド）、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -chemokine（IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC1-4、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンジン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなど）の他に、例えば温血動物（例えば、トリ、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒトなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

【0030】具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を決定する方法である。本発明のリガンド決定方法においては、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば該G蛋白質共役型レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

【0031】より具体的には、本発明は、標識した試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリ

ガンドの決定方法、

標識した試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜面分に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

標識した試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

【0032】試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、および試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

【0033】本発明のリガンド決定方法の具体的な説明を以下にする。まず、リガンド決定方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるか、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるか、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いて

もよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行うことができる。

【0034】したがって、本発明のリガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであってもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質を含有する細胞の膜面分を用いてもよい。本発明のリガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。

【0035】細胞膜面分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる面分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500rpm~3000rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000rpm~30000rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜面分とする。該膜面分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜面分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^6$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であ

るのが好適である。なお、発現量が多いほど膜面当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0036】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の～の方法を実施するためには、適当なG蛋白質共役型レセプター画分と、標識した試験化合物が必要である。G蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター画分が、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識した試験化合物としては、 ^3H 、 ^{125}I 、

^{14}C 、 ^{35}S などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP(バソアクティブ・インテスチナル・アンド・リレイテッド・ペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、グラジキニン、CGRP(カルシトニンジーン・リレイテッド・ペプチド)、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -chemokine(IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC1-4、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなどが好適である。

【0037】具体的には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドの決定方法を行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4~10(望ましくはpH6~8)のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS(3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸)、Tween 80[®](花王・アトラス社)、シグトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF(フェニルメタン・スルホニルフルオリド)、ロイペプチン、E-64(ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~1.0mlの該レセ

プター溶液に、一定量(5000cpm~500000cpm)の ^3H 、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{35}S などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは γ -カウンターで計測する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が0cpmを越える試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドとして選択することかできる。

【0038】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の～の方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

【0039】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンド決定用キットは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有するものである。本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. リガンド決定用試薬

測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution(ギブコ社製)に、0.05%のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を加えたも

の。孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5 \times 10⁵個/穴で継代し、37℃、5%CO₂95%airで2日間培養したもの。

【0040】標識試験化合物

市販の〔³H〕、〔¹⁴C〕、〔³⁵S〕などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの水溶液の状態のものを-4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、ノタノール等に溶解する。

非標識試験化合物

標識化合物を同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

2. 測定法

12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

標識試験化合物を5 μ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5 μ l加えておく。

反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH+1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

【0041】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合することができるリガンドとしては、例えば脳、下垂体、脾臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的にはアンジオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP（バソアクティブインテスティナルアンドリレイテッドペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレイテッドペプチド）、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -chemokine（IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC1-4、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログastrin、ヒスタミン、ニューロテニン、TRH、パンクレアティンクボリンペプチド、ガラニンなどが挙げられる。

【0042】（2）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤

上記（1）の方法において、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に体するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤として使用することができる。例えば、生体内において本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない患者がいる場合に、

- （イ）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）脳細胞などに本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該脳細胞を該患者に移植することなどによって、該患者の脳細胞におけるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を充分に発揮させることができる。したがって、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤などとして用いることができる。

- 【0043】本発明のDNAを上記治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のDNAを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアガムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモク油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

【0044】注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンシルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば温血哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツシ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど）に対して投与することができる。該DNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0045】（3）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドまたはその塩は、リガンドに対して結合性を有しているため、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。本発明の定量法は、例えば競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下のまたはなどに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

人江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）

人江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和

54年発行）

【0046】（4）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を変化させる（例、阻害する、促進させる）化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることかできる。このような化合物には、G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性

（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明のG蛋白質共役型レセプターアゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト）などが含まれる。

【0047】すなわち、本発明は、（i）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドを接触させた場合と

（ii）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法においては、（i）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドに、リガンドを接触させた場合と（ii）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドに、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば該G蛋白質共役型レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

【0048】より具体的には、本発明は、標識したリガンドを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標

識したリガンドの該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法

、標識したリガンドを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0049】標識したリガンドを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物（例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドなど）を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のG蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物および試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

【0050】本発明のG蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物（例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドなど）を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合

と、本発明のG蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物および試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0051】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜面分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後該候補化合物が実際にヒトのG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜面分をそのまま用いば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。しかしながら、本発明のヒト由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとG蛋白質共役型レセプターとの結合を阻害する化合物を効率的にスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がG蛋白質共役型レセプターアゴニストかG蛋白質共役型レセプターアンタゴニストかを評価することができる。本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。まず、本発明のスクリーニング方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、温血動物の臓器の膜面分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。

【0052】G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約

されるものではない。例えば遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス

(nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献[Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年]に記載の方法に従って行うことができる。したがって、本発明のスクリーニング方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであってもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質を含有する細胞の膜面分を用いてもよい。

【0053】本発明のスクリーニング方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。膜面分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500rpm~3000rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000rpm~30000rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜面分とする。該膜面分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜面分のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^6$ 分子であるのが好ましく、 $10^4 \sim 10^7$ 分子であ

るのが好適である。なお、発現量が多いほど膜面分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0054】リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプターとの結合を阻害する化合物をスクリーニングする前記の〜を実施するためには、適当なG蛋白質共役型レセプター画分と、標識したリガンドが必要である。G蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、

$[^3S]$ などで標識されたリガンドなどを利用することができる。具体的には、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニングを行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜面分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4~10 (望ましくはpH6~8) のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどのリガンドXとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM (花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。

【0055】さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~1.0mlの該レセプター溶液に、一定量 (5000cpm~500000cpm) の標識したリガンドを添加し、同時に $10^{-6}M \sim 10^{-10}M$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは γ -カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント (B₀) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント (B-NSB) を100%とした時、特異的結合量 (B-NSB) が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0056】リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセ

ター蛋白質との結合を阻害する化合物スクリーニングする前記の～の方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞としては、天然型の本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を有する細胞株（例えば、マウス脾臓β細胞株MIN6など）、前述の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質発現細胞株などが望ましい。試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0057】リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有するものである。本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。孔径0.45μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃

で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

【0058】G蛋白質共役型レセプター標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10⁵個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したものの。

標識リガンド

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識したリガンド水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。

リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

【0059】2. 測定法

12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

10⁻⁶～10⁻¹⁰Mの試験化合物溶液を5μl加えた後、標識リガンドを5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに10⁻⁶Mのリガンドを5μl加えておく。

反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

液体シンチレーションカウンター（パイクマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent of Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

【0060】

【数1】

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB: Percent of Maximum Binding

B: 検体を加えた時の値

NSB: Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀: 最大結合量

【0061】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプターとの結合を阻害する化合物であり、具体的にはG蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆるG蛋白質共役型レセプターアゴニスト）、あるいは該刺激活性を有しない化合物（いわゆるG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト）である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。該G蛋白質共役型レセプターアゴニス

トは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬組成物として有用である。逆に、G蛋白質共役型レセプターアンタゴニストは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドが有する生理活性を抑制することから、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、アルツハイマー病、癲癇症、一般不安障害、不眠症、重症鬱病、軽症鬱病、気分変動症、脅迫神経症、骨関節炎、骨粗鬆症、易恐怖性障害、消化性潰瘍、リウマチ関節炎、精神分裂症、社会恐怖症、潰瘍性大腸炎、不安定狭心症、急性肺炎、狭心症、喘息、動脈硬化症、慢性肺炎、糖尿病性腎症、嘔吐、胃炎、インシュリン依存性糖尿病、アレルギー性鼻炎、腎炎、痛み、精神分裂症などの症状の治療・予防薬として、医薬組成物に成型し用いることができる。

【0062】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアガムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモク油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

【0063】注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ソドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例え

ば、アルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンブルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば温血哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0064】（5）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体または抗血清の製造

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）または抗血清は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。例えば、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩（以下、G蛋白質共役型レセプターと略称する場合がある）は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担

体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

【0065】モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化G蛋白質共役型レセプターと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髓腫細胞としては例えば、NS-1、P3U1、SP2、A20、AP-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG (好ましくはPEG1000～PEG6000) が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0066】抗G蛋白質共役型レセプター抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、G蛋白質共役型レセプター抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相 (例、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合した抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したG蛋白質共役型レセプターを加え、固相に結合した抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地で行なわれる。選別および育種用培地として

は、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地 (和光純薬工業 (株)) あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、日水製薬 (株)) などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗G蛋白質共役型レセプター抗体価の測定と同様にして測定できる。

10

20

30

40

50

【0067】(b)モノクローナル抗体の精製
抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法 (例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体 (例、DEAE) による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法) に従って行われる。以上の(1)および(2)の方法に従って製造させる本発明のG蛋白質共役型レセプター抗体は、G蛋白質共役型レセプターを特異的に認識することができるので、被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、(i)本発明のG蛋白質共役型レセプターに反応する抗体と、被検液および標識化G蛋白質共役型レセプターとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化G蛋白質共役型レセプターの割合を測定することを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法、(2)被検液と担体上に不溶化した抗体および標識化された抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法において、一方の抗体がG蛋白質共役型レセプターのN端部を認識する抗体で、他方の抗体がG蛋白質共役型レセプターのC端部に反応する抗体であることを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法を提供する。

【0068】本発明のG蛋白質共役型レセプターを認識するモノクローナル抗体 (以下、抗G蛋白質共役型レセプター抗体と称する場合がある) を用いてG蛋白質共役型レセプターの測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b'), F a b', あるいはF a b画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量 (例えばG蛋白質共役型レセプター量) に対応した抗体、抗原もしくは

抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられる。放射性同位元素としては、例えば $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、

$[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレオセイン、チオシアネートなどが、発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0069】抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。サンドイッチ法においては不溶化した抗G蛋白質共役型レセプター抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化抗G蛋白質共役型レセプター抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中のG蛋白質共役型レセプター量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。本発明のサンドイッチ法によるG蛋白質共役型レセプターの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる抗G蛋白質共役型レセプター抗体はG蛋白質共役型レセプターの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、G蛋白質共役型レセプターのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0070】本発明のG蛋白質共役型レセプター抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、

イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0071】これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてG蛋白質共役型レセプターの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる【例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、Methods in ENZYMOLOGY, Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照]。以上のように、本発明のG蛋白質共役型レセプター抗体を用いることによって、G蛋白質共役型レセプターを感度良く定量することができる。

【0072】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB

Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸

【0073】

EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
EIA	: エンザイムイムノアッセイ
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸

【0074】

Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸
Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基
Ph	: フェニル基
TC	: チアソリジン-4(R)-カルボキ
サミド基	

dNTP	: デオキシリボヌクレオシド 5'トリフォスフェート
IP TG	: イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド
X-gal	: 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド

【0075】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

- 〔配列番号：1〕本発明のヒト型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の全アミノ酸配列を示す。
- 10 〔配列番号：2〕本発明のヒト型G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を示す。
- 〔配列番号：3〕実施例2で用いたプライマーr o o - 5 i F 3の配列を示す。
- 〔配列番号：4〕実施例2で用いたプライマーr o o - 5 i Rの配列を示す。
- 〔配列番号：5〕実施例4で用いたプライマーr o o - 5 i R 2の配列を示す。
- 〔配列番号：6〕実施例4で用いたプライマーr o o - 5 i R 4の配列を示す。
- 20 〔配列番号：7〕実施例5で用いたプライマーEM-L Iの配列を示す。
- 〔配列番号：8〕実施例5で用いたプライマーr o o - 5 i F 5の配列を示す。
- 〔配列番号：9〕実施例5で用いたプライマーr o o - 5 i F 6の配列を示す。
- 〔配列番号：10〕実施例6で用いたプライマーB L 5 - 5 Aの配列を示す。
- 〔配列番号：11〕実施例6で用いたプライマーB L 5 - Aの配列を示す。
- 30 〔配列番号：12〕参考例4で得られたp u D - B L 5に含まれるウサギ胃幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされるウサギ胃幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列を示す。
- 〔配列番号：13〕参考例4で得られたp u D - B L 5に含まれるウサギ胃幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列を示す。
- 〔配列番号：14〕参考例1において用いられた、ウサギ型G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。
- 40 〔配列番号：15〕参考例1において用いられた、ウサギ型G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。後述の実施例6で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/p h B L 5は、平成8年2月13日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM B P - 5392として寄託されている。
- 50

【0076】

【実施例】以下に参考例および実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0077】

【参考例1】G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを増幅させるための合成DNAプライマーの製造

公知のヒト由来ガラニンレセプター (HUMGALAREC)、ラット由来 α -1B-アドレナジックレセプター (RATADR1B)、ヒト由来 β -1-アドレナジックレセプター (HUMADRB1)、ウサギ由来IL-8レセプター (RAB1L8RSB)、ヒト由来オピオイドレセプター (HUMOP1ODRE)、ウシ由来サブスタンスKレセプター (BTSKR)、ヒト由来ソマトスタチンレセプター-2 (HUMSR12A)、ヒト由来ソマトスタチンレセプター-3 (HUMSSTR3Y)、ヒト由来ガストリンレセプター (HUMGAR E)、ヒト由来コレシストキニンAレセプター (HUM CCKAR)、ヒト由来ドパミンレセプター-D5 (H UMD1B)、ヒト由来セロトニンレセプター5HT1 E (HUM5HT1E)、ヒト由来ドパミンレセプター D4 (HUMD4C)、マウス由来セロトニンレセプター-2 (MMSERO)、ラット由来 α -1A-アドレナジックレセプター (RATADRA1A) およびラット由来ヒスタミンH2レセプター (S57565) の第2膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を比較し、類似性の高い部分を見いだした。

【0078】また、公知のヒト由来ガラニンレセプター (HUMGALAREC)、ラット由来A1アデノシンレセプター (RAT1ADREC)、ブタ由来アンジオテンシンレセプター (PIGA2R)、ラット由来セロトニンレセプター (RAT5HTRTC)、ヒト由来ド *

5'-GYCACCAACNWSTTTCATCCTSWNHCTG-3'

[SはGまたはCを示し、YはCまたはTを示し、WはAまたはTを示し、HはA、CまたはTを示し、NはIを示す。] (配列番号：14)

5'-ASNSANRAAGSARTAGANGANRGGRTT-3'

[RはAまたはGを示し、SはGまたはCを示し、NはIを示す。] (配列番号：15)

S、Y、W、H、RおよびSは、合成時に複数の塩基に混合して合成する。

【0080】

【参考例2】ウサギ胃幽門部平滑筋からのpoly(A)⁺RNA画分の調製およびcDNAの合成

ウサギ胃幽門部平滑筋よりグアニジンイソチオシアネート法により Total RNAを調製後 (Kaplan B.B. et al., Biochem. J. 183, 181-184 (1979))、mRNA精製キット (ファルマシア社) を用いて、poly(A)⁺RNA画分を調製した。次に、poly(A)⁺RNA画分5 μ gにプライマーとしてランダムDNAヘキサマー (BRL ※50

*パミンレセプター (S58541)、ヒト由来ガストリンリリーシングペプチドレセプター (HUMGRP R)、マウス由来GRP、ポンベシンレセプター (MUSGRP BOM)、ラット由来バスキュラータイプ1アンジオテンシンレセプター (RRVT1A11R)、ヒト由来ムスカリニコアセチルコリンレセプター (HS HM4)、ヒト由来 β -1アドレナジックレセプター (HUMDRB1)、ヒト由来ガストリンレセプター (HUMGARE)、ラット由来コレシストキニンレセプター (RATCCKAR)、ラット由来リガンド不明レセプター (S59748)、ヒト由来ソマトスタチンレセプター (HUMSST28A)、ラット由来リガンド不明レセプター (RNGPROCR)、マウス由来ソマトスタチンレセプター1 (MUSSTR11A)、ヒト由来 α -A1-アドレナジックレセプター (HUMA1 AADR)、マウス由来デルタオピオイドレセプター (S66181) およびヒト由来ソマトスタチンレセプター-3 (HUMSSTR3Y) の第7膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を比較し、類似性の高い部分を見いだした。

【0079】上記の () 内の略語はDNASIS Gene/Prot einシーケンスデータベース (CD019、日立ソフトウェアエンジニアリング) を用いて GenBank/EMBL Data Bank を検索した際に示される整理番号であり、通常エントリーネームと呼ばれるものである。特に、多くのレセプター蛋白質をコードするcDNAで一致する塩基部分を基準とし、その他の部分においてもなるべく多くのレセプターcDNAと配列の一致性を高めるために混合塩基の導入を計画した。この配列をもとに、共通する塩基配列に相補的である配列番号：14または配列番号：15で表わされる塩基配列を有する合成DNA2本を作成した。

※社)を加え、モロニイマウス白血病ウイルスの逆転写酵素 (BRL社) により、添付バッファーを用いて相補DNAを合成した。反応後の産物はフェノール：クロロホルム (1：1) で抽出し、エタノール沈殿を行なった後、30 μ lのTEに溶解した。

【0081】

【参考例3】ウサギ胃幽門部平滑筋由来cDNAを用いたPCR法による受容体cDNAの増幅と塩基配列の決定

参考例2でウサギ胃幽門部平滑筋より調製したcDNA 1 μ lを鋳型として使用し、参考例1で合成したDN

Aプライマーを用いてPCR法による増幅を行なった。反応液の組成は、合成DNAプライマー（5'プライマー配列および3'プライマー配列）各100 pM、0.25 mM dNTPs、Taq DNA polymerase 1 μ l および酵素に付属のバッファー10 μ lで、総反応溶液量は100 μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキン・エルマー社）を用い、96°C・30秒、45°C・1分、60°C・3分のサイクルを25回繰り返した。増幅産物の確認は1.2%アカロースゲル電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行なった。

【0082】

【参考例4】PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解読による新規レセプター候補クローンの選択

参考例3で行なったPCR後の反応産物は1.4%のアカロースゲルを用いて分離し、バンドの部分のカミソリで切り出した後、エレクトロエリキュション、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ってDNAを回収した。TAクローニングキット（インビトロゲン社）の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCRTMIIへサブクローニングした。これを大腸菌JM109 competent cell（宝酒造株式会社）に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離し、形質転換体を複数得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置PI-100（クラボウ社）を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNAの一部をさらにRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。

【0083】塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（ABI社）を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた塩基配列を基に、DNASIS（日立システムエンジニアリング社）を用いてホモロジー検索を行なった結果、サブスタンスKレセプター蛋白質をコードするクローンは全体の約6割存在することが判明した。そこで、高頻度にクローニングされているサブスタンスKレセプター蛋白質のクローンを除くため、参考例3で得られたPCR産物を、制限酵素ApaIまたはBbsIで消化した。ApaIおよびBbsIは、ウサギサブスタンスKレセプター蛋白質をコードするDNAを切断するので該DNAを断片化させることができる。このようにしてサブスタンスKレセプター蛋白質をコードするDNAを除去した後、残ったPCR産物を上記の方法でクローニングし、塩基配列を決定した。これらを基に、上記

の方法でホモロジー検索を行った結果、形質転換体エシエリヒア コリ（Escherichia coli）JM109/puDL5の保有するプラスミドに挿入されたcDNA断片が新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードすることが分かった。該cDNA断片の塩基配列を〔図4〕に示した。さらに確認するために、DNASIS（日立システムエンジニアリング社）を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換した後〔図4〕、疎水性プロット〔図5〕を行なった結果、G蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを示す疎水性ドメインが存在することが確認された。また、アミノ酸配列に基づきホモロジー検索を行なった結果、例えば、ヒト由来ヒスタミンH₂レセプター蛋白質（JH0449）と32.6%、マウス由来 β -アドレナリンレセプター蛋白質（S00260）と27.7%、ラット由来ドーパミンD₁レセプター蛋白質（S11378）と、28.8%、ヒト由来 α 1C-アドレナリンレセプター蛋白質（JN0765）と27.9%、マウス由来サブスタンスKレセプター蛋白質（S20303）と22.4%、ヒト由来 μ タイプオピオイドレセプター蛋白質（S41075）と24.4%のホモロジーを有する新規なレセプター蛋白質であることが判明した。上記の（ ）内の略語は、NBRF-P I R（National Biochemical Research Foundation - Protein Information Resource）に登録されている際の整理番号であり、通常 Accession Number と呼ばれるものである。

【0084】実施例1

ヒト胃 poly(A)⁺RNAからのヒト胃由来cDNAの合成：ヒト胃 poly(A)⁺RNA（ニッポンジェーン社）5 μ gにプライマーとしてランダムDNA-ヘキサマー（BRL社、米国）を加え、モロニマウス白血病ウイルスの逆転写酵素（BRL社）によりヒト胃由来cDNAを合成した。得られたヒト胃由来cDNAをフェノール：クロロホルム（1：1）で抽出し、エタノール沈殿に付した後、50 μ lの蒸留水に溶解した。

【0085】実施例2

ヒト胃由来cDNAからPCR法によるヒト型G蛋白質共役型レセプターcDNA断片の増幅：実施例1で製造したヒト胃cDNA 0.5 μ lを鋳型とし、参考例4で得られたウサギ型G蛋白質共役型レセプターcDNA配列（プラスミドpDuBL5に組込まれたDNA）の内の第2膜貫通領域付近と第5膜貫通領域付近の配列を参照して合成したプライマーro-5 i F3（配列：5'-TCCTCCTGGGACTCATCATCATGC-3'、配列番号：3）およびプライマーro-5 i R（配列：5'-AATCCCCACCATCACA GACCCAGGAGTGAAGA-3'、配列番号：4）を反応液中でそれぞれ200 nMとなるようういて、PCR反応を行なった。該PCR反応においては、反応液はDNAPolymerase EX Taq（宝酒造）を用

い、これに添付のバッファー $2.5\mu\text{l}$ と dNTP $200\mu\text{M}$ を加え水で $25\mu\text{l}$ として調製した。該PCR反応においてはサーマルサイクラーは GeneAmp9600 (パーキンエルマー社) を用い、 $96^\circ\text{C}\cdot 1$ 分後、 $94^\circ\text{C}\cdot 30$ 秒、 $68^\circ\text{C}\cdot 2$ 分のサイクルを31回繰り返した。得られた増幅産物を1.2%アガロース電気泳動に付し、エチジウムブロマイド染色し約410bpのバンドを切り出し、遠心濾過チューブ(ミリポア社)で遠心濾過し、フェノール抽出次いでエタノール沈殿を行なってDNAを回収した。回収したDNAをTAクローニングキット(Invitrogen社)のマニュアルに従い、プラスミドベクターpCRTMIIへサブクローニングし、大腸菌JM109に導入し、得られた形質転換体をアンピシリンを含むLB培地で培養後、自動プラスミド抽出器(クラボウ社)でプラスミドを得た。このプラスミドをDye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社)を用い、マニュアルに従い反応させ、塩基配列を蛍光自動DNAシーケンサー(ABI社)により解読した。解読した塩基配列を〔図3〕の上段に示す。また、ウサギ型G蛋白質共役型レセプターcDNA配列を〔図3〕の下段に示す。〔図3〕から、本発明のヒト型G蛋白質共役型レセプターcDNA配列は、ウサギ型G蛋白質共役型レセプターcDNA配列の対応する部分と90%の相同性を有していることが分かった。

【0086】実施例3 ヒト小脳 poly(A)⁺RNA画分からのcDNAの合成：ヒト小脳 poly(A)⁺RNA (ニッポンゲン社) $1\mu\text{g}$ から Marathon cDNA amplification kit (Clontech社)により、マニュアルにしたがって二本鎖のcDNAを合成し、トリシン-EDTAバッファー $10\mu\text{l}$ に溶解した。このうち $1\mu\text{l}$ をさらにトリシン-EDTAバッファーで50倍に希釈した。

【0087】実施例4

ヒト小脳cDNAからの5'側配列の増幅：まず5'側の配列を増幅するために、実施例2で明らかとなった塩基配列を利用して第5膜貫通領域付近にプライマー ro-5 i R 2 (配列：5'-AACCTGCCATAAACAAAGGTGGTCC-3'、配列番号：5)、プライマー ro-5 i R 4 (配列：5'-ATTCCATCTGCATAGGCCTCTGAG-3'、配列番号：6)を合成した。実施例3において Marathon cDNA amplification kit により製造した50倍希釈のcDNA溶液 $5\mu\text{l}$ を鋳型とし、プライマーには ro-5 i R 2 とキット付属のアダプタープライマーAP1とを反応液中でそれぞれ 200nM となるように用いて、PCR反応を行なった。なお、反応液はDNA polymerase としてEXTaq (宝酒造)を用い、Marathon cDNA amplification kit に添付のバッファー $5\mu\text{l}$ を加え、 dNTP を $200\mu\text{M}$ となるように加え、水で $50\mu\text{l}$ となるように加え調製した。PCR反応は、サーマルサイクラー(パーキンエルマー社)を用い、 $94^\circ\text{C}\cdot 1$ 分後、9

$4^\circ\text{C}\cdot 30$ 秒、 $72^\circ\text{C}\cdot 4$ 分のサイクルを5回、 $94^\circ\text{C}\cdot 30$ 秒、 $70^\circ\text{C}\cdot 4$ 分のサイクルを5回、 $94^\circ\text{C}\cdot 30$ 秒、 $68^\circ\text{C}\cdot 4$ 分のサイクルを25回繰り返した。さらにこの反応液をトリシン-EDTAバッファーで50倍に希釈したもの $5\mu\text{l}$ を鋳型として、プライマーをAP2 (キット付属のアダプタープライマー)と ro-5 i R 4 の組み合わせに換え、 $94^\circ\text{C}\cdot 1$ 分後、 $94^\circ\text{C}\cdot 30$ 秒、 $68^\circ\text{C}\cdot 3$ 分のサイクルを28回繰り返した。増幅産物に酢酸アンモニアを加えてエタノール沈殿したものを鋳型として、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社)を用い、マニュアルに従い反応させ、蛍光自動DNAシーケンサー(ABI社)により解読した。その結果、得られたDNAは、実施例2で明らかとなった塩基配列の5'上流域に約340bpにわたって新たな配列を有していることが分かった。

【0088】実施例5

ヒトゲノムDNAからPCR法を用いた受容体DNAの3'側の配列の取得：ヒトゲノムライブラリー(クローンテック社)、EMBL3ゲノムライブラリー(クローンテック社)から次の手法で、ヒト型全長を取得した。まずEMBL3ベクターのレフトアームに特異的なプライマーEM-L1 (配列：5'-GGTGTCCGACTTATGCCCGAGAAGATGTTGAGCAA-3'、配列番号：7)および3'側の増幅のために ro-5 i F 5 (配列：5'-GTATGATCAGATCGGTGGAGAACTGCTGG-3'、配列番号：8)および ro-5 i F 6 (配列：5'-TCTATGTTGGTTCGGTCCCTGGAGCATTTG-3'、配列番号：9)を合成した。これらおよび GeneAmp9600 (パーキンエルマー社)を用いてPCR反応を行った。なお、鋳型となるファージ液は 99°C で15分間熱変性を行った後に遠心した上清を各反応チューブあたり $1\mu\text{l}$ 用いた。PCR反応の反応液は GeneAmp9600に添付のバッファー $2.5\mu\text{l}$ 、 dNTP を $200\mu\text{M}$ となるように加え、プライマーを 200nM となるように加え、水で $25\mu\text{l}$ として調製した。3'側の増幅は、プライマーには ro-5 i F 5 とEM-L1を用い、温度条件 $94^\circ\text{C}\cdot 1$ 分後、 $98^\circ\text{C}\cdot 10$ 秒、 $68^\circ\text{C}\cdot 15$ 分のサイクルを30回繰り返した。この反応液をTEバッファーで100倍に希釈したもの $2.5\mu\text{l}$ を鋳型として、プライマーを ro-5 i F 6 とEM-L1との組み合わせに換え、温度条件 $94^\circ\text{C}\cdot 1$ 分後、 $98^\circ\text{C}\cdot 10$ 秒、 $68^\circ\text{C}\cdot 15$ 分のサイクルを24回繰り返した。得られた増幅産物を1.2%アガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色し約2200bpのバンドを切り出した。DNAを実施例2と同様の方法で回収し、プラスミドベクターpCRTMIIへサブクローニングし、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社)でマニュアルに従い反応し、蛍光自動DNAシーケンサー(ABI社)により解読した。ここにおいて、実施例4の

5'側配列とあわせてヒト型G蛋白質共役型レセプターの全アミノ酸配列(配列番号:1)の全コード領域を含むと考えられるゲノムDNAおよびcDNA由来の配列(配列番号:2)が得られた。塩基配列とそれがコードするアミノ酸配列を〔図1〕に示す。疎水性プロットを行なったところ、TM1~TM7で示す疎水性ドメインが存在することが確認された〔図2〕。

【0089】実施例6

ヒト小脳由来cDNAからPCR法を用いたcDNAの全コード領域を含むDNA断片の増幅:実施例4で製造したヒト小脳cDNAを鋳型として、ヒト小脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の全アミノ酸配列をコードするcDNA断片の増幅を行った。まず実施例3で明らかとなったcDNAの配列を基に、プライマーBL5-5A(配列:5'-AGATCTCGAGGTGTCCGAGTGGCTATGTAT-3'配列番号:10)およびプライマーBL5-A(配列:5'-GCCTACTCACTTTCTTTTTC-3'配列番号:11)を合成した。上記BL5-5Aは受容体cDNAのスタートコドンを含み、制限酵素XhoI部位を付加した-15~+6(スタートコドンATGのAを+1とする)に対応するセンス配列で、BL5-Aは受容体cDNAのストップコドンを含む+849~+869に対応するアンチセンス配列である。PCR反応は、実施例1において Marathon cDNA amplification kit により調製したcDNAをトリシン-EDTAバッファーで100倍に希釈したもの2.5μlを鋳型として、実施例2と同様の方法で反応液を調製し、94℃・1分、98℃・10秒、52℃・20秒、68℃・1分のサイクルを34回繰り返した。増幅産物を2%アガロース電気泳動 * 30

配列

Met	Tyr	Ser	Phe	Met	Ala	Gly	Ser	Ile	Phe	Ile	Thr	Ile	Phe	Gly	Asn
1				5				10					15		
Leu	Ala	Met	Ile	Ile	Ser	Ile	Ser	Tyr	Phe	Lys	Gln	Leu	His	Thr	Pro
				20				25					30		
Thr	Asn	Phe	Leu	Ile	Leu	Ser	Met	Ala	Ile	Thr	Asp	Phe	Leu	Leu	Gly
				35				40					45		
Phe	Thr	Ile	Met	Pro	Tyr	Ser	Met	Ile	Arg	Ser	Val	Glu	Asn	Cys	Trp
				50				55					60		
Tyr	Phe	Gly	Leu	Thr	Phe	Cys	Lys	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Asp	Leu	Met
				65				70					75		80
Leu	Ser	Ile	Thr	Ser	Ile	Phe	His	Leu	Cys	Ser	Val	Ala	Ile	Asp	Arg
				85				90					95		
Phe	Tyr	Ala	Ile	Cys	Tyr	Pro	Leu	Leu	Tyr	Ser	Thr	Lys	Ile	Thr	Ile
				100				105					110		
Pro	Val	Ile	Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Trp	Ser	Val	Pro	Gly	Ala
				115				120					125		
Phe	Ala	Phe	Gly	Val	Val	Phe	Ser	Glu	Ala	Tyr	Ala	Asp	Gly	Ile	Glu
				130				135					140		
Gly	Tyr	Asp	Ile	Leu	Val	Ala	Cys	Ser	Ser	Ser	Cys	Pro	Val	Met	Phe

* 動に付し、エチジウムブロマイド染色し、約900bpのバンドを切り出し、実施例3と同様の方法でDNAを回収し、プラスミドベクターpCRTMIIへサブクローニングし、プラスミドp hBL5を得た。これを大腸菌JM109に導入し、Escherichia coli JM109/p hBL5を製造した。得られた形質転換体に挿入されたcDNA断片の配列を解析した。その結果、このDNA断片はヒト型G蛋白質共役型レセプターcDNAの全コード領域(配列番号:1)を含む断片であることが分かった。

【0090】

【発明の効果】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質および該蛋白質をコードするDNAは、リガンドの決定、抗体および抗血清の入手、組み替え型レセプター蛋白質の発現系の構築、同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成、遺伝子治療等に用いることができる。特に、G蛋白質共役型のレセプターの構造・性質の解明はこれらの系に作用するユニークな医薬品の開発につながる。

【0091】

【配列表】

【配列番号:1】

配列の長さ:306

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

4546

145150155160
 Asn Lys Leu Trp Gly Thr Thr Leu Phe Met Ala Gly Phe Phe Thr Pro
165170175
 Gly Ser Met Met Val Gly Ile Tyr Gly Lys Ile Phe Ala Val Ser Arg
180185190
 Lys His Ala His Ala Ile Asn Asn Leu Arg Glu Asn Gln Asn Asn Gln
195200205
 Val Lys Lys Asp Lys Lys Ala Ala Lys Thr Leu Gly Ile Val Ile Gly
210215220
 Val Phe Leu Leu Cys Trp Phe Pro Cys Phe Phe Thr Ile Leu Leu Asp
225230235240
 Pro Phe Leu Asn Phe Ser Thr Pro Val Val Leu Phe Asp Ala Leu Thr
245250255
 Trp Phe Gly Tyr Phe Asn Ser Thr Cys Asn Pro Leu Ile Tyr Gly Phe
260265270
 Phe Tyr Pro Trp Phe Arg Arg Ala Leu Lys Tyr Ile Leu Leu Gly Lys
275280285
 Ile Phe Ser Ser Cys Phe His Asn Thr Ile Leu Cys Met Gln Lys Glu
290295300
 Ser Glu
 305

【0092】

【配列番号：2】

配列の長さ：918

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

* 特徴を決定した方法：S

配列

ATGTATTCAT TTATGGCAGG ATCCATATTC ATCACAATAT TTGGCAATCT TGCCATGATA 60
 ATTTCCATTT CCTACTTCAA GCAGCTTCAC ACACCAACCA ACTTCCTCAT CCTCTCCATG 120
 GCCATCACTG ATTTCTCCTT GGGATTACAC ATCATGCCAT ATAGTATGAT CAGATCGGTG 180
 GAGAACTGCT GGTATTTTGG GCTTACATTT TGCAAGATTT ATTATAGTTT TGACCTGATG 240
 CTTAGCATAA CATCCATTTT TCATCTTTGC TCAGTGGCCA TTGATAGATT TTATGTATA 300
 TGTTACCCAT TACTTTATTC CACCAAAATA ACTATTCCAG TCATTAAGAG ATTGCTACTT 360
 CTATGTTGGT CGGTCCTGG AGCATTGGCC TTCGGGGTGG TCTTCTCAGA GGCTATGCA 420
 GATGGAATAG AGGGCTATGA CATCTTGTTT GCTTGTTCCT GTTCTGCCC AGTGATGTTT 480
 AACAAGCTAT GGGGGACCAC CTGTTTATG GCAGGTTTCT TCACTCCTGG GTCTATGATG 540
 GTGGGGATTT ATGGCAAAAT TTTTGCAGTA TCCAGAAAAC ATGCTCATGC CATCAATAAC 600
 TTGCGAGAAA ATCAAAATAA TCAAGTGAAG AAAGACAAAA AAGCTGCCAA AACTTTAGGA 660
 ATAGTGATAG GAGTTTCTT ATTATGTTGG TTTCTTGTT TCTTACAAT TTTATTGGAT 720
 CCCTTTTGA ACTTCTCTAC TCCTGTAGTT TTGTTGATG CCTTGACATG GTTGGCTAT 780
 TTAACTCCA CATGTAATCC GTTAATATAT GGTTTCTTCT ATCCCTGGTT TCGCAGAGCA 840
 CTGAAGTACA TTTTGCTAGG TAAATTTTC AGCTCATGTT TCCATAATAC TATTTTGTGT 900
 ATGCAAAAAG AAAGTGAG 918

【0093】

【配列番号：3】

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

※ TCCTCCTGGG ACTCATCATC ATG

C 24

【0094】

【配列番号：4】

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

※50 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AATCCCCACC ATCACAGACC CAG
GAGTGAA GA 32

【配列番号：5】

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AACCTGCCAT AAACAAGGTG GTCC 24

【0096】

【配列番号：6】

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATTCTATCTG CATAGGCCTC TGAG 24

【0097】

【配列番号：7】

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGTGTCGAC TTATGCCCGA GAAGATGTTG AGCAA 35

【0098】

【配列番号：8】

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

Ala Val Thr Asp Phe Leu Leu Gly Leu Ile Ile Met Pro Tyr Ser Met

1 5 10 15

Val Arg Ser Val Glu Asn Cys Trp Tyr Phe Gly Leu Ala Phe Cys Lys

20 25 30

Ile His Tyr Ser Phe Asp Leu Met Leu Ser Ile Thr Ser Ile Phe His

35 40 45

Leu Cys Ser Val Ala Ile Asp Arg Phe Tyr Ala Ile Cys Tyr Pro Leu

50 55 60

Arg Tyr Ser Thr Lys Met Thr Ile Pro Val Ile Lys Arg Leu Val Phe

65 70 75 80

Leu Cys Trp Ser Val Pro Gly Ala Phe Ala Phe Gly Val Val Phe Ser

85 90 95

Glu Ala Tyr Ala Asp Gly Ile Glu Gly Tyr Asp Thr Leu Val Ala Cys

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTATGATCAG ATCGGTGGAG AACTGCTGG 29

【0099】

【配列番号：9】

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCTATGTTGG TCGGTCCCTG GAGCATTTG 29

【0100】

【配列番号：10】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

20 配列

AGATCTCGAG GTGTCCGAGT GGCTATGTAT 30

【0101】

【配列番号：11】

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCCTACTCAC TTTCTTTTG C 21

【0102】

【配列番号：12】

配列の長さ：225

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：ペプチド

49 100 105 110
 Ser Ser Ser Cys Pro Val Thr Phe Asn Lys Leu Trp Gly Thr Thr Leu
 115 120 125
 Phe Met Ala Gly Phe Phe Thr Pro Gly Ser Val Met Val Gly Ile Tyr
 130 135 140
 Gly Lys Ile Phe Ala Val Ser Arg Lys His Ala Leu Ala Ile Asn Asn
 145 150 155 160
 Thr Ser Glu Asn Gln Asn Thr Gln Met Lys Lys Asp Thr Lys Ala Ala
 165 170 175
 Lys Thr Leu Gly Ile Val Met Gly Val Phe Leu Leu Cys Trp Phe Pro
 180 185 190
 Cys Phe Phe Thr Ile Leu Leu Asp Pro Phe Leu Asn Phe Ser Thr Pro
 195 200 205
 Ala Val Leu Phe Asp Ala Leu Thr Trp Phe Gly Tyr Phe Asn Ser Thr
 210 215 220
 Cys

【0103】

【配列番号：13】

配列の長さ：675

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

* 20 特徴を決定した方法：S

配列

GCAGTCACCG ACTTCCTCCT GGGACTCATC ATCATGCCAT ACAGTATGGT CAGATCAGTG 60
 GAGAACTGCT GGTATTTTGG CCTTGCATTC TGCAAGATTC ATTATAGTTT TGAATTGATG 120
 CTTAGCATAA CATCCATTTT CCATCTTTGC TCAGTGGCCA TTGATAGATT TTATGCTATC 180
 TGTACCCCTT TAAGATATTC CACCAAAATG ACGATCCCAG TGATTAAACG GTTGGTTTTT 240
 CTCTGCTGGT CAGTCCCTGG AGCCTTTGCA TTTGGCGTGG TTTTCTCGGA AGCCTATGCA 300
 GATGGAATAG AAGGCTATGA TACTTTGGTT GCTTGTTCCT GCTCCTGCCC AGTGACGTTT 360
 AACAAAGCTCT GGGGGACCAC CTGTGTTTATG GCAGGTTTCT TCACTCCTGG GTCTGTGATG 420
 GTGGGGATTT ATGGCAAAAT TTTTGTGTA TCCAGAAAAC ATGCTCTTGC AATTAACAAC 480
 ACATCAGAAA ACCAAAATAC TCAAATGAAG AAAGACACAA AAGCAGCCAA AACTTTAGGA 540
 ATAGTGATGG GCGTTTTTTT ATTATGTTGG TTCCCTGTT TCTTCACGAT TTTGTTGGAT 600
 CCCTTTTGA ACTTCTCAAC CCCTGCAGTT TTATTGATG CCTTGACATG GTTTGGCTAT 660
 TTAACTCCA CATGT 675

【0104】

【配列番号：14】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：SはGまたはCを示し、YはCまたはTを示し、WはAまたはTを示し、HはA、CまたはTを示し、NはIを示す。

配列

GYCACCAACN WSTTCATCCT SWNHCTG 27

【0105】

【配列番号：15】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：RはAまたはGを示し、SはGまたはCを示し、NはIを示す。

配列

ASNSANRAAG SARTAGANGA NRGGRIT 27

40 【図面の簡単な説明】

〔図1〕実施例6で得られた、本発明のヒト型G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアミノ酸配列と、それをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔図2〕実施例6で得られた、本発明のヒト型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性プロットを示す。

〔図3〕実施例6で得られた、本発明のヒト型G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA断片の塩基配列（上段に示す）と、参考例4で得られたウサギ胃腸幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質c

※50 DNA断片の塩基配列（下段に示す）とを示す。星印は

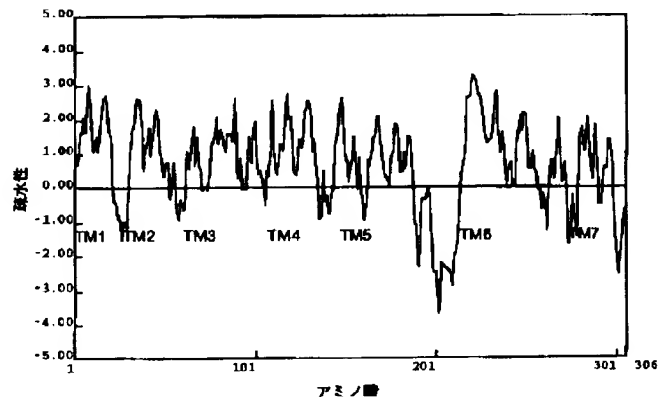
両者が同じ塩基配列である場合を示す。

〔図4〕参考例4で得られた、ウサギ胃幽門部平滑筋よりPCR増幅によって得た新規レセプター蛋白質cDNAクローンpuD-BL5に含まれるウサギ胃幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。PCR増幅に用いた合成プライマーに相当する部分 *

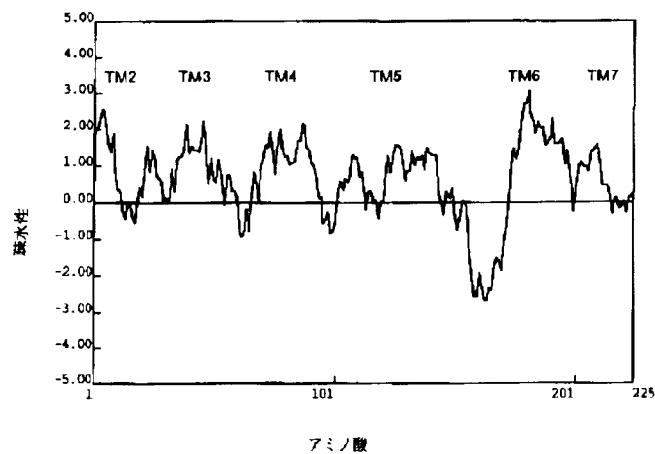
*は除かれている。

〔図5〕参考例4で得られた、図4に示したアミノ酸配列をもとに作成した、puD-BL5に含まれるウサギ胃幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされる蛋白質の疎水性プロットを示す。この図からTM2～TM7で示す疎水性ドメインの存在が示唆される。

【図2】



【図5】



【図1】

1	TGACAAAATTCTATCTGTTCTTGTCTTTTGAAGGAAAAATTCAATTGCTCTGAATATGGA	60
1		1
61	AATAGATCTTGCCAGAAAATGAAAGATCTCTGGGTGTCGAGTGGCTATGTATTTCATTT	120
1	MetTyrSerPhe	4
121	ATGGCAGGATCCATATTCATCACAATATTTGGCAATCTTGCCATGATAATTTCCATTTCC	180
5	MetAlaGlySerIlePheIleThrIlePheGlyAsnLeuAlaMetIleIleSerIleSer	24
181	TACTTCAAGCAGCTTCACACACCAACCAACTTCCTCATCCTCTCCATGGCCATCACTGAT	240
25	TyrPheLysGlnLeuHisThrProThrAsnPheLeuIleLeuSerMetAlaIleThrAsp	44
241	TTCCTCCTGGGATTCAACCATCATGCCATATAGTATGATCAGATCGGTGGAGAAGTCTGG	300
45	PheLeuLeuGlyPheThrIleMetProTyrSerMetIleArgSerValGluAsnCysTrp	64
301	TATTTTGGGCTTACATTTTGCAGATTTATTATAGTTTGGACCTGATGCTTAGCATAACA	360
65	TyrPheGlyLeuThrPheCysLysIleTyrTyrSerPheAspLeuMetLeuSerIleThr	84
361	TCCATTTTTCATCTTTGCTCAGTGGCCATTGATAGATTTTATGCTATATGTTACCCATTA	420
85	SerIlePheHisLeuCysSerValAlaIleAspArgPheTyrAlaIleCysTyrProLeu	104
421	CTTTATTCACCAAAATAACTATTCAGTCATTAAAAGATTGCTACTTCTATGTTGGTGG	480
105	LeuTyrSerThrLysIleThrIleProValIleLysArgLeuLeuLeuLeuCysTrpSer	124
481	GTCCCTGGAGCATTTCCTTCGGGGTGGTCTTCTCAGAGGCCTATGCAGATGGAATAGAG	540
125	ValProGlyAlaPheAlaPheGlyValValPheSerGluAlaTyrAlaAspGlyIleGlu	144
541	GGCTATGACATCTTGGTTGCTTGTTCAGTTCTGCCAGTGATGTTCAACAAGCTATGG	600
145	GlyTyrAspIleLeuValAlaCysSerSerSerCysProValMetPheAsnLysLeuTrp	164
601	GGGACCACCTTGTTTATGGCAGGTTTCTTCACTCCTGGGTCTATGATGGTGGGGATTAT	660
165	GlyThrThrLeuPheMetAlaGlyPhePheThrProGlySerMetMetValGlyIleTyr	184
661	GGCAAAATTTTTCAGTATCCAGAAAACATGCTCATGCCATCAATAACTTGCGAGAAAA	720
185	GlyLysIlePheAlaValSerArgLysHisAlaHisAlaIleAsnAsnLeuArgGluAsn	204
721	CAAAATAATCAAGTGAAGAAAGACAAAAAAGCTGCCAAAACCTTTAGGAATAGTCATACCA	780
204	GlnAsnAsnGlnValLysLysAspLysLysAlaAlaLysThrLeuGlyIleValIleGly	224
781	GTTTCTTATTATGTTGGTTTCCTTGTTCCTTCACAATTTTATTGGATCCCTTTTGAAC	840
225	ValPheLeuLeuCysTrpPheProCysPhePheThrIleLeuLeuAspProPheLeuAsn	244
841	TTCTCTACTCCTGTAGTTTGTGTTGATGCCTTGACATGGTTGGCTATTTTAACTCCACA	900
245	PheSerThrProValValLeuPheAspAlaLeuThrTrpPheGlyTyrPheAsnSerThr	264
901	TGTAATCCGTAAATATATGGTTTCTTCTATCCCTGGTTTCGAGAGCACTGAAGTACATT	960
265	CysAsnProLeuIleTyrGlyPhePheTyrProTrpPheArgArgAlaLeuLysTyrIle	284
951	TTGCTAGGTAAAATTTTCAGCTCATGTTTCCATAATACTATTTTGTGTATGCAAAAAGAA	1020
285	LeuLeuGlyLysIlePheSerSerCysPheHisAsnThrIleLeuCysMetGlnLysGlu	304
1021	AGTGAGTAGGCTTTTTCTGCA	1041
305	SerGlu***	306

【図3】

```

      1      10      20      30      40      50      60      70
5' TCCTCCTGGGATTCACCATCATGCCATATAGTATGATCAGATCGGTGGAGAACTGCTGGTATTTTGGGCT
   *****
5' TCCTCCTGGGACTCATCATCATGCCATACAGTATGGTCAGATCAGTGGAGAACTGCTGGTATTTTGGCCT
21      30      40      50      60      70      80      90

71      80      90      100     110     120     130     140
TACATTTTGCAAGATTTATTATAGTTTGGACCTGATGCTTAGCATAACATCCATTTTCATCTTTGCTCA
   *****
TGCATTCTGCAAGATTCATTATAGTTTGGACTTGATGCTTAGCATAACATCCATTTTCATCTTTGCTCA
91      100     110     120     130     140     150     160

141     150     160     170     180     190     200     210
GTGGCCATTGATAGATTTTATGCTATATGTTACCCATTACTTTATTCCACCAAAATAACTATTCCAGTCA
   *****
GTGGCCATTGATAGATTTTATGCTATCTGTTACCCCTTTAAGATATTCCACCAAAATGACGATCCCAGTGA
161     170     180     190     200     210     220     230

211     220     230     240     250     260     270     280
TAAAAAGATTGCTACTTCTATGTTGGTCGGTCCCTGGAGCATTGCGCTCGGGGTGGTCTTCTCAGAGGC
   *****
TAAACGGTTGGTTTTCTCTGCTGGTCAGTCCCTGGAGCCTTTGCATTGCGGTGGTCTTCTCGGAAGC
231     240     250     260     270     280     290     300

281     290     300     310     320     330     340     350
CTATGCAGATGGAATAGAGGGCTATGACATCTTGGTTGCTTGTTCCAGTTCCTGCCCAGTGATGTTCAAC
   *****
CTATGCAGATGGAATAGAAGGCTATGATACTTTGGTTGCTTGTTCCAGTTCCTGCCCAGTGACGTTCAAC
301     310     320     330     340     350     360     370

351     360     370     380     390     400
AAGCTATGGGGGACCACCTTGTATTATGGCAGGTTTCTTCACTCCTGGGTCTATGATGGT 3'
   *****
AAGCTCTGGGGGACCACCTTGTATTATGGCAGGTTTCTTCACTCCTGGGTCTGTGATGGT 3'
371     380     390     400     410     420

```


【図4】

```

5'   9      18      27      36      45      54
    GCA GTC ACC GAC TTC CTC CTG GGA CTC ATC ATC ATG CCA TAC AGT ATG GTC AGA
    ---
    Ala Val Thr Asp Phe Leu Leu Gly Leu Ile Ile Met Pro Tyr Ser Met Val Arg

      63      72      81      90      99      108
    TCA GTG GAG AAC TGC TGG TAT TTT GGC CTT GCA TTC TGC AAG ATT CAT TAT AGT
    ---
    Ser Val Glu Asn Cys Trp Tyr Phe Gly Leu Ala Phe Cys Lys Ile His Tyr Ser

      117      126      135      144      153      162
    TTT GAC TTG ATG CTT AGC ATA ACA TCC ATT TTC CAT CTT TGC TCA GTG GCC ATT
    ---
    Phe Asp Leu Met Leu Ser Ile Thr Ser Ile Phe His Leu Cys Ser Val Ala Ile

      171      180      189      198      207      216
    GAT AGA TTT TAT GCT ATC TGT TAC CCT TTA AGA TAT TCC ACC AAA ATG ACG ATC
    ---
    Asp Arg Phe Tyr Ala Ile Cys Tyr Pro Leu Arg Tyr Ser Thr Lys Met Thr Ile

      225      234      243      252      261      270
    CCA GTG ATT AAA CGG TTG GTT TTT CTC TGC TGG TCA GTC CCT GGA GCC TTT GCA
    ---
    Pro Val Ile Lys Arg Leu Val Phe Leu Cys Trp Ser Val Pro Gly Ala Phe Ala

      279      288      297      306      315      324
    TTT GGC GTG GTT TTC TCG GAA GCC TAT GCA GAT GGA ATA GAA GGC TAT GAT ACT
    ---
    Phe Gly Val Val Phe Ser Glu Ala Tyr Ala Asp Gly Ile Glu Gly Tyr Asp Thr

      333      342      351      360      369      378
    TTG GGT GCT TGT TCC AGC TCC TGC CCA GTG ACG TTC AAC AAG CTC TGG GGG ACC
    ---
    Leu Val Ala Cys Ser Ser Ser Cys Pro Val Thr Phe Asn Lys Leu Trp Gly Thr

      387      396      405      414      423      432
    ACC TTG TTT ATG GCA GGT TTC TTC ACT CCT GGG TCT GTG ATG GTG GGG ATT TAT
    ---
    Thr Leu Phe Met Ala Gly Phe Phe Thr Pro Gly Ser Val Met Val Gly Ile Tyr

      441      450      459      468      477      486
    GGC AAA ATT TTT GCT GTA TCC AGA AAA CAT GCT CTT GCA ATT AAC AAC ACA TCA
    ---
    Gly Lys Ile Phe Ala Val Ser Arg Lys His Ala Leu Ala Ile Asn Asn Thr Ser

      495      504      513      522      531      540
    GAA AAC CAA AAT ACT CAA ATG AAG AAA GAC ACA AAA GCA GCC AAA ACT TTA GGA
    ---
    Glu Asn Gln Asn Thr Gln Met Lys Lys Asp Thr Lys Ala Ala Lys Thr Leu Gly

      549      558      567      576      585      594
    ATA GTG ATG GGC GTT TTT TTA TTA TGT TGG TTT CCC TGT TTC TTC ACG ATT TTG
    ---
    Ile Val Met Gly Val Phe Leu Leu Cys Trp Phe Pro Cys Phe Phe Thr Ile Leu

      603      612      621      630      639      648
    TTG GAT CCC TTT TTG AAC TTC TCA ACC CCT GCA GTT TTA TTT GAT GCC TTG ACA
    ---
    Leu Asp Pro Phe Leu Asn Phe Ser Thr Pro Ala Val Leu Phe Asp Ala Leu Thr

      657      666      675
    TGG TTT GGC TAT TTT AAC TCC ACA TGT 3'
    ---
    Trp Phe Gly Tyr Phe Asn Ser Thr Cys

```

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 P 21/08

C 1 2 P 21/08

C 1 2 Q 1/02

7823 - 4B

C 1 2 Q 1/02

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 33/566

// A 6 1 K 39/395

A 6 1 K 39/395

D

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)